

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 1 月 4 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 7 5 0 2 6  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 3 7 5 0 2 6 ]

REC'D 23 DEC 2004

WIPO

EC

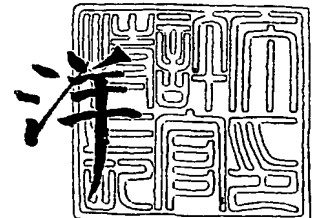
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社バイオマスター

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 J103769290  
【提出日】 平成15年11月 4日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 5/00  
C12N 5/08  
C12N 5/22

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都渋谷区広尾 1 - 3 - 9  
【氏名】 吉村 浩太郎

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都台東区上野桜木 1 - 7 - 5 - 2 0 3  
【氏名】 松本 大輔

【特許出願人】  
【識別番号】 503368498  
【氏名又は名称】 株式会社バイオマスター

【代理人】  
【識別番号】 100078282  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】  
【識別番号】 100062409  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】  
【識別番号】 100113413  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 森下 夏樹

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 001878  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

幹細胞を調製する方法であって、

- A) 脂肪吸引廃液を得る工程；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；
- C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；および
- D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程、

を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記脂肪吸引廃液は、生理食塩水、またはリンゲル液を使用して調製される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記遠心分離は、 $800 \times g$  以下の範囲内の速度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記遠心分離は、 $400 \times g$  以上の範囲内の速度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記密度勾配遠心分離は、 $370 \times g \sim 1100 \times g$  の範囲内の速度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記密度勾配遠心分離は、 $20^{\circ}\text{C}$  における比重が  $1.076 \sim 1.078 \text{ g/ml}$  である媒体を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記密度勾配遠心分離の媒体は、フィコール、パーコール、およびスクロースからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記密度勾配遠心分離の媒体は、フィコールである、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記収集された細胞層の比重は、比重  $1.050 \sim 1.075$  の間の範囲である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記細胞層の収集は、ピペットを用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記細胞層を、DMEM、M199、MEM、HBSS、Ham's F12、BME、RPMI 1640、MCDB104、MCDB153 (KGM) およびそれらの混合物からなる群より選択される成分を含む培地中で培養する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 に記載の方法によって調製される幹細胞。

**【請求項 13】**

CD13、CD29、CD44、CD49d、CD71、CD90、およびCD105を発現する、請求項 12 に記載の幹細胞。

**【請求項 14】**

幹細胞を調製するためのシステムであって、以下：

- A) 脂肪吸引廃液を得るための手段；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る手段；および
- C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う手段；

を含む、システム。

**【請求項 15】**

請求項 14 に記載のシステムであって、以下；

- D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する手段、

をさらに含む、システム。

【請求項 16】

外植片を調製する方法であって、以下：

- A) 脂肪吸引廃液を得る工程；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；
- C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；
- D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および
- E) 収集された細胞層を培養して、外植片を得る工程、

を含む、方法。

【請求項 17】

組織片を調製する方法であって、以下：

- A) 脂肪吸引廃液を得る工程；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；
- C) 該細胞画分より収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、

を含む、方法。

【請求項 18】

組織片を調製する方法であって、以下：

- A) 脂肪吸引廃液を得る工程；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；
- C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；
- D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および
- E) 収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、

を含む、方法。

【請求項 19】

組織片を移植する方法であって、以下：

- A) 脂肪吸引廃液を得る工程；
- B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；
- C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；
- D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および
- E) 収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、

を含む、方法。

【請求項 20】

幹細胞を調製するための脂肪吸引廃液の使用。

【請求項 21】

以下からなる群から選択される細胞を調製する方法であって、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られた幹細胞を培養する工程を含む、方法：

血管内皮前駆細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、および筋細胞。

【請求項 22】

分化細胞を調製するための方法であって、

- A) a) 請求項 1 に記載の方法で得られた幹細胞と、  
b) 所望の部位に対応する分化細胞と、

を混合して混合物を得る工程；および

B) 該混合物における該幹細胞の分化が生じるに十分な条件で培養する工程、を包含する、方法。

【請求項 23】

前記分化細胞は、間葉系細胞を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記分化細胞は、脂肪細胞、骨髓細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞および脾細胞からなる群より選択される、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 25】**

さらに、前記分化細胞への分化を促進する因子をさらに包含する、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記混合は、副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミン D、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸塩、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、サイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド (HMBA)、ジメチルアセトアミド (DMA)、ジブチル cAMP (dbcAMP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヨードデオキシウリジン (IdU)、ヒドロキシウレア (HU)、シトシンアラビノシド (AraC)、マイトマイシン C (MMC)、酪酸ナトリウム (NaBu)、ポリブレンおよびセレンウムからなる群より選択される成分のうち少なくとも 1 つを含む培養液中で行われる、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 27】**

請求項 1 に記載の方法で得られた幹細胞と、所望の部位に対応する分化細胞とを含む、細胞混合物。

**【請求項 28】**

前記細胞混合物は、前記幹細胞の分化が生じるに十分な条件に暴露されたものである、請求項 27 に記載の細胞混合物。

**【請求項 29】**

細胞移植のための組成物であって、

- a) 請求項 1 に記載の方法で得られた幹細胞；および
- b) 所望の部位に対応する分化細胞、

を含有する、組成物。

**【請求項 30】**

前記移植は、前記所望の部位に移植される、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 31】**

前記幹細胞と、前記分化細胞との比率は、約 1 : 10 ~ 約 10 : 1 である、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 32】**

前記幹細胞と、前記分化細胞との比率は、約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 である、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 33】**

前記幹細胞と、前記分化細胞とは、ほぼ等量で含有される、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 34】**

前記分化細胞は、間葉系細胞を含む、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 35】**

前記分化細胞は、脂肪細胞、骨髓細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞および脾細胞からなる群より選択される、請求項 29 に記載の組成物。

**【請求項 36】**

副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミン D、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸塩、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、脱メ

チル化剤、ヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、サイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド (HMBA)、ジメチルアセトアミド (DMA)、ジブチル cAMP (dbcAMP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヨードデオキシウリジン (IdU)、ヒドロキシウレア (HU)、シトシンアラビノシド (AraC)、マイトマイシンC (MMC)、酪酸ナトリウム (NaBu)、ポリブレンおよびセレンウムからなる群より選択される成分のうち少なくとも1つをさらに含む、請求項29に記載の組成物。

【請求項37】

前記幹細胞と、前記分化細胞とは、同種異系である、請求項29に記載の組成物。

【請求項38】

前記幹細胞と、前記分化細胞とは、同系である、請求項29に記載の組成物。

【請求項39】

分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するための方法であって、

A) a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞；および b) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、組成物を提供する工程、ならびに

B) 被検体に、該組成物を投与する工程、を包含する、方法。

【請求項40】

分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するため医薬であって、

a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞；

b) 所望の部位に対応する分化細胞；および

c) 薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、医薬。

【請求項41】

a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞と、 b) 所望の部位に対応する分化細胞との混合物の、分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するための医薬の調製のための使用。

【請求項42】

美容状態を処置または改善するための方法であって、

A) a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞；および b) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、組成物を提供する工程、ならびに

B) 被検体に、該組成物を投与する工程、を包含する、方法。

【請求項43】

美容状態を処置または改善するため医薬であって、

a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞；

b) 所望の部位に対応する分化細胞；および

c) 薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、医薬。

【請求項44】

a) 請求項1に記載の方法で得られた幹細胞と、 b) 所望の部位に対応する分化細胞との混合物の、美容状態を処置または改善するための医薬の調製のための使用。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】脂肪組織から幹細胞を調製する方法およびシステム

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、脂肪吸引廃液から幹細胞を調製する方法、システム、およびそのような方法およびシステムによって調製された幹細胞、ならびにその幹細胞の用途に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

幹細胞の利用を中心とした、再生医療は、ここ数年で、かなりの発展を遂げてきた。従来であれば、存在しないと考えられていた、組織幹細胞が種々の組織から発見され、同定されてきた。このように、再生医療による疾患治療が最近注目を浴びている。

## 【0003】

しかし、再生医療は、臓器ないし組織機能不全を呈する多くの患者に対して日常的に適応するまでには至っていない。臓器ないし組織機能不全の治療として、臓器移植のほか、医療機器での補助システムの利用がごく限られた患者に適応されているにすぎない。しかし、これらの治療法には、ドナー不足、拒絶、感染、耐用年数などの問題がある。特に、ドナー不足は深刻な問題であり、骨髄移植の場合、国内外で骨髄ないし臍帯血バンクが次第に充実してきたといっても、限られたサンプルを多くの患者に提供することが困難である。従って、これらの問題を克服するために幹細胞治療とその応用を中心とした再生医学に対する期待がますます高まっている。臓器（例えば、心臓、血管など）の移植に外来性組織を使用する際の主な障害は免疫拒絶反応である。同種異系移植片（または同種移植片、allograft）と異種移植片（xenograft）で起こる変化がよく知られている。

## 【0004】

受精卵は、原腸陥入の後、内胚葉、中胚葉および外胚葉の3つの胚葉に分かれ、外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。

## 【0005】

脂肪細胞、骨、靱帯、心筋などを含む間葉系細胞は、身体の骨格を形成するに重要な働きを有していることから、その細胞を含む集団、組織など、間葉系細胞の再生医療および移植医療への応用の期待が高まっている。特に、骨髄間葉系幹細胞は、中胚葉系の種々の臓器に分化することが報告されるようになっており、再生医療の中心として注目を浴びている。しかし、その分化の条件は、分化誘導剤（例えば、デキサメサゾンなど）を含む特殊な培地を必要とすることが知られるかなり特殊なものを必要とするとされている（非特許文献1）。

## 【0006】

間葉系幹細胞は、中胚葉以外にも分化することが報告されていることから、その応用範囲は従来以上に広がっている。しかし、そのような分化の条件は、上述のもの以上に特殊である。骨髄由来の間葉系幹細胞の表面抗原は、CD105（+）、CD73（+）、CD29（+）、CD44（+）、CD14（-）、CD34（-）、CD45（-）であるとされている。

## 【0007】

間葉系幹細胞は、組織幹細胞の一種であり、天然にはごく少量（ヒト新生児の骨髄に1万分の1存在し、その後急速に減少する。高齢者では200万分の1といわれる）存在するだけであり、分離することが困難である。また、その調製には、多大な費用を要する。さらに、骨髄採取は一般的にドナーに痛みを伴う。さらに、特に選別されたロットの血清を使用して、そのような幹細胞の使用にさらにコストと労力を加えなければ、そのような細胞は分化を誘導することなく培養することが困難である。

## 【0008】

一方、脂肪にも幹細胞があることが分かってきた(特許文献1~3、非特許文献2~3)。脂肪にある幹細胞は、他の組織(例えば、骨髄)に比べて、その供給源が豊富であり、存在率も多いようであることから、その利用が注目されている。しかし、脂肪組織から幹細胞を調製する従来方法(特許文献4および5)は、その供給源が骨髄よりは豊富に入手可能であるという利点を有するものの、その供給源の脂肪組織をコラゲナーゼなどの酵素を用いて処理する必要がある、依然として簡便かつ大量に調製することは不可能である。幹細胞および前駆細胞の再生医療への応用を考えると、ヒト(特に、被検体自身)から簡便かつ大量に均質な幹細胞・前駆細胞を簡便に調製する方法の確立が望まれている。

【特許文献1】WO00/53795

【特許文献2】WO03/022988

【特許文献3】WO01/62901

【特許文献4】特表2003-523767

【特許文献5】特表2002-537849

【非特許文献1】幹細胞・クローン 研究プロトコル 中辻編、羊土社(2001)

【非特許文献2】Zuk, P. A., et al., Tissue Engineering, Vol. 7, 211-228, 2001

【非特許文献3】Zuk, P. A., et al., Molecular Biology of the Cell Vol., 13, 4279-4295, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ヒト(特に、被検体自身)から簡便かつ大量に、均質な幹細胞・前駆細胞を簡便に調製する方法を提供することが、本発明の課題である。

【0010】

さらに、本発明の幹細胞・前駆細胞を用いて、組織片または移植片を大量かつ簡便に調製する方法を提供することが、本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、予想外に、脂肪吸引廃液が幹細胞を多量に含むことを見出し、脂肪吸引廃液からの幹細胞の調製方法を確立することによって、本発明を完成した。

【0012】

したがって、本発明は、以下を提供する。

1. 幹細胞を調製する方法であって、

A) 脂肪吸引廃液を得る工程；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；

C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；および

D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程、

を含む、方法。

2. 前記脂肪吸引廃液は、生理食塩水、またはリンゲル液を使用して調製される、項目1に記載の方法。

3. 前記遠心分離は、 $800 \times g$ 以下の範囲内の速度で行われる、項目1に記載の方法。

4. 前記遠心分離は、 $400 \times g$ 以上の範囲内の速度で行われる、項目1に記載の方法。

5. 前記密度勾配遠心分離は、 $370 \times g \sim 1100 \times g$ の範囲内の速度で行われる、項目1に記載の方法。

6. 前記密度勾配遠心分離は、 $20^\circ\text{C}$ における比重が $1.076 \sim 1.078 \text{ g/ml}$ である媒体を用いて行われる、項目1に記載の方法。

7. 前記密度勾配遠心分離の媒体は、フィコール、パーコール、およびスクロースからなる群より選択される、項目1に記載の方法。

8. 前記密度勾配遠心分離の媒体は、フィコールである、項目7に記載の方法。



9. 前記収集された細胞層の比重は、比重1.050～1.075の間の範囲である、項目1に記載の方法。

10. 前記細胞層の収集は、ピペットを用いて行われる、項目1に記載の方法。

11. 前記細胞層を、DMEM、M199、MEM、HBSS、Ham's F12、BME、RPMI1640、MCDB104、MCDB153 (KGM) およびそれらの混合物からなる群より選択される成分を含む培地中で培養する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

12. 項目1に記載の方法によって調製される幹細胞。

13. CD13、CD29、CD44、CD49d、CD71、CD90、およびCD105を発現する、項目12に記載の幹細胞。

14. 幹細胞を調製するためのシステムであって、以下：

A) 脂肪吸引廃液を得るための手段；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る手段；および

C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う手段；を含む、システム。

15. 項目14に記載のシステムであって、以下；

D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する手段、をさらに含む、システム。

16. 外植片を調製する方法であって、以下：

A) 脂肪吸引廃液を得る工程；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；

C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；

D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および

E) 収集された細胞層を培養して、外植片を得る工程、を含む、方法。

17. 組織片を調製する方法であって、以下：

A) 脂肪吸引廃液を得る工程；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；

C) 該細胞画分より収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、を含む、方法。

18. 組織片を調製する方法であって、以下：

A) 脂肪吸引廃液を得る工程；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；

C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；

D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および

E) 収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、を含む、方法。

19. 組織片を移植する方法であって、以下：

A) 脂肪吸引廃液を得る工程；

B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；

C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；

D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程；および

E) 収集された細胞層を培養して、組織片を得る工程、を含む、方法。

20. 幹細胞を調製するための脂肪吸引廃液の使用。

21. 以下からなる群から選択される細胞を調製する方法であって、項目1～11のいずれか1項に記載の方法によって得られた幹細胞を培養する工程を含む、方法：

血管内皮前駆細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、および筋細胞。

22. 分化細胞を調製するための方法であって、

A) a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞と、

b) 所望の部位に対応する分化細胞と、  
を混合して混合物を得る工程；および

B) 該混合物における該幹細胞の分化が生じるに十分な条件で培養する工程、を包含する、方法。

23. 前記分化細胞は、間葉系細胞を含む、項目22に記載の方法。

24. 前記分化細胞は、脂肪細胞、骨髄細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞および脾細胞からなる群より選択される、項目22に記載の方法。

25. さらに、前記分化細胞への分化を促進する因子をさらに包含する、項目22に記載の方法。

26. 前記混合は、副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン(IBMx)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸塩、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、サイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、ジメチルアセトアミド(DMA)、ジブチルcAMP dbcAMP)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヨードデオキシウリジン(IdU)、ヒドロキシウレア(HU)、シトシンアラビノシド(AraC)、マイトマイシンC(MMC)、酪酸ナトリウム(NaBu)、ポリブレンおよびセレンウムからなる群より選択される成分のうち少なくとも1つを含む培養液中で行われる、項目22に記載の方法。

27. 項目1に記載の方法で得られた幹細胞と、所望の部位に対応する分化細胞とを含む、細胞混合物。

28. 前記細胞混合物は、前記幹細胞の分化が生じるに十分な条件に暴露されたものである、項目27に記載の細胞混合物。

29. 細胞移植のための組成物であって、

a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞；および

b) 所望の部位に対応する分化細胞、

を含有する、組成物。

30. 前記移植は、前記所望の部位に移植される、項目29に記載の組成物。

31. 前記幹細胞と、前記分化細胞との比率は、約1:10~約10:1である、項目29に記載の組成物。

32. 前記幹細胞と、前記分化細胞との比率は、約1:2~約2:1である、項目29に記載の組成物。

33. 前記幹細胞と、前記分化細胞とは、ほぼ等量で含有される、項目29に記載の組成物。

34. 前記分化細胞は、間葉系細胞を含む、項目29に記載の組成物。

35. 前記分化細胞は、脂肪細胞、骨髄細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞および脾細胞からなる群より選択される、項目29に記載の組成物。

36. 副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン(IBMx)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸塩、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、サイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、ジメチルアセトアミド(DMA)、ジブチルcAMP dbcAMP)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヨードデオキシウリジン(IdU)、ヒドロキシウレア(HU)

)、シトシンアラビノシド (AraC)、マイトマイシンC (MMC)、酪酸ナトリウム (NaBu)、ポリブレンおよびセレンウムからなる群より選択される成分のうち少なくとも1つをさらに含む、項目29に記載の組成物。

37. 前記幹細胞と、前記分化細胞とは、同種異系である、項目29に記載の組成物。

38. 前記幹細胞と、前記分化細胞とは、同系である、項目29に記載の組成物。

39. 分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するための方法であって、

A) a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞; およびb) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、組成物を提供する工程、ならびに

B) 被検体に、該組成物を投与する工程、を包含する、方法。

40. 分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するため医薬であって、

a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞;

b) 所望の部位に対応する分化細胞; および

c) 薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、医薬。

41. a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞と、b) 所望の部位に対応する分化細胞との混合物の、分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するための医薬の調製のための使用。

42. 美容状態を処置または改善するための方法であって、

A) a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞; およびb) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、組成物を提供する工程、ならびに

B) 被検体に、該組成物を投与する工程、を包含する、方法。

43. 美容状態を処置または改善するため医薬であって、

a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞;

b) 所望の部位に対応する分化細胞; および

c) 薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、医薬。

44. a) 項目1に記載の方法で得られた幹細胞と、b) 所望の部位に対応する分化細胞との混合物の、美容状態を処置または改善するための医薬の調製のための使用。

#### 【発明の効果】

##### 【0013】

本発明は、ヒト (特に、被検体自身) から簡便かつ大量に、均質な幹細胞・前駆細胞を簡便に調製する方法を提供する。

##### 【0014】

さらに、本発明の幹細胞・前駆細胞を用いて、組織片または移植片を大量かつ簡便に調製する方法が提供される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0015】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞 (例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など) は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書 (定義を含めて) が優先する。

##### 【0016】

## (用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

## 【0017】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本発明で使用される「細胞」の数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリン-エオシン (H E) 染色を行うことにより細胞外マトリクス (例えば、エラスチンまたはコラーゲン) および細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積 (例えば、 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ ) あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞 (例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞) であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0018】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能 (すなわち多能性) (「*pluripotency*」) を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹 (ES) 細胞または組織幹細胞 (組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう) であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞 (たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など) もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは胚性幹細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。

## 【0019】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵 (共通) 幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

## 【0020】

本明細書において「前駆細胞」とは、子孫にあたる細胞が特定の分化形質を発現することが明らかな場合、分化形質を発現していない未分化な親細胞をいう。例えば、子孫にあたる細胞が、血管内皮細胞である場合、その前駆細胞を血管内皮前駆細胞という。また、幹細胞を分化させることによって得られた前駆細胞は、その幹細胞の「分化細胞」である。

## 【0021】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

## 【0022】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような間葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、間葉系由来の細胞が使用され得る。

## 【0023】

本明細書において「間葉系幹細胞」とは、間葉に見出される幹細胞をいう。本明細書ではMSCと略されることがある。ここで、間葉とは、多細胞動物の発生各期に認められる、上皮組織間の間隙をうめる星状または不規則な突起をもつ遊離細胞の集団と、それに伴う細胞間質によって形成される組織をいう。間葉系幹細胞は、増殖能と、骨細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞（心筋細胞を含む）、ストローマ細胞、腱細胞、脂肪細胞への分化能を有する。間葉系幹細胞は、患者から採取した骨髄細胞等を培養または増殖、軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化させるために使用され、または歯槽骨、関節症等の骨、軟骨、関節などの再建材料として使用されており、その需要は大きい。また、間葉系幹細胞は、血液細胞、リンパ系細胞へも分化し得ることから、その需要がますます高まっている。

## 【0024】

本明細書において「脂肪吸引廃液」とは、（１）脂肪吸引時に一緒に吸引された液体（例えば、トゥメセント液および血液を含む）または、（２）吸引脂肪を液体（例えば、生理食塩水）で洗浄する際に生じた廃液をいう。

## 【0025】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

## 【0026】

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、膵実質細胞、膵管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。本発明において用いられる場合、分化細胞は、集団または組織の形態であってもよい。

## 【0027】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞およびその分化細胞、造血幹細胞およびその分化細胞ならびに間葉系幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞およびその分化細胞、膵幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、間葉系由来の細胞が使用され得る。

## 【0028】

本明細書において「所望の部位」とは、被検体における任意の部位であって、処置が望まれる部位をいう。本発明では、そのような所望の部位は、被検体における任意の臓器、組織における部位が選択され得ることが理解される。

## 【0029】

本明細書において「組織」（tissue）とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するので

あれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。本明細書において組織が対象として使用される場合、そのような組織としては、処置が意図される任意の組織が意図され得る。

#### 【0030】

本発明において、臓器が対象とされる場合、そのような臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において臓器が対象として使用される場合、どのような臓器が対象であってもよいが、好ましくは、間葉系の組織（例えば、脂肪、骨、靱帯など）が対象とされ得るがそれに限定されない。

#### 【0031】

本明細書において「分化が生じるに十分な条件」は、分化が生じるような時間、培地、温度、湿度などを指す。脂肪吸引廃液由来の幹細胞から分化細胞を調製する方法としては、(1) 培地中に分化誘導剤（例えば、デキサメサゾンなど）を添加する方法、および(2) 所望の部位に対応する分化細胞とともに培養する方法が挙げられる。

#### 【0032】

上記(1) 培地中に分化誘導剤（例えば、デキサメサゾンなど）を添加する方法においては、従来公知である分化誘導剤（例えば、デキサメタゾン (dexamethasone) などの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、アスコルベート-2-ホスフェート (ascorbate-2-phosphate)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート (glycerophosphate)、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF・bFGF・EGF・IGF・TGF $\beta$ ・ECGF・BMP・PDGFをはじめとする増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸（亜セレン酸ナトリウムなど）、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド (HMBA)、ジメチルアセトアミド (DMA)、ジブチルcAMP (dbcAMP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヨードデオキシウリジン (IdU)、ヒドロキシウレア (HU)、シトシンアラビノシド (AraC)、マイトマイシンC (MMC)、酪酸ナトリウム (NaBu)、ポリブレン、セレンウムが挙げられるがそれらに限定されない) を、幹細胞の培養培地に添加する方法が挙げられるが、これに限定されない。

#### 【0033】

上記(2) 幹細胞を所望の部位に対応する分化細胞とともに培養する方法では、本明細書の開示に従って、脂肪吸引廃液由来の幹細胞と分化細胞とを混合すれば、その分化細胞への分化が進捗する。また、本明細書の内容を考慮すれば、このような条件は、単に脂肪吸引廃液由来の幹細胞または分化細胞を単独で維持するような条件と重複し得ることが理解される。したがって、そのような条件は、適宜変更することができるが、好ましくは、本発明の脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、組み合わされる分化細胞およびその混合物におけ

る組成に応じて変更するとよい。また、いったんそのような好ましい条件が設定されると、以後、そのような条件は、同様の混合物を処置するために用いられ得る。本発明では、このような分化が生じるに十分な条件は、インビトロであってもインビボであってもエキソビボであってもよい。インビボの場合は、移植された体内の部分における条件がそのまま適用される。本発明では、幹細胞と分化細胞とを混合した後は、すぐに移植してインビボの環境においてもよく、インビトロで混合培養をしてもよい。自家移植の場合はエキソビボとも呼ばれ得る。

#### 【0034】

本明細書において「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「インビボ」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置(例えば、本明細書にいう所望の部位)をいう。

#### 【0035】

本明細書において「インビトロ」(in vitro)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

#### 【0036】

本明細書において「エキソビボ」(ex vivo)とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。

#### 【0037】

そのような分化が生じるに十分な条件としては、例えば、それぞれ独立して、5時間以上の培養、pH 5~10、20℃~45℃の温度(例えば、37℃)、80%以上の湿度(例えば、100%)、M199培地の使用、ヘパリン5mg/500mlの添加、酸性FGF 2μg/500mlの添加、FBS(15%)の添加、NaHCO<sub>3</sub>の添加、酸素濃度10~30%(例えば、20%)、CO<sub>2</sub>濃度2~10%(例えば、5%)、ゼラチンコートディッシュの使用、フィーダー細胞の存在などが挙げられるがそれらに限定されない。一例として、5時間以上の培養、M199培地(500mlに、NaHCO<sub>3</sub>を2.2g、FBS(15%)、酸性FGF 2μg、ヘパリン5mgを加える)にて37度、酸素20%、炭酸ガス5%、湿度100%、ゼラチンコートディッシュにて培養するという条件が例示されるがそれに限定されない。

#### 【0038】

上記の条件は、分化細胞(例えば、脂肪細胞)および脂肪吸引廃液由来の幹細胞を維持するための条件としても採用され得るがそれに限定されない。

#### 【0039】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞を分化させる条件としては、分化細胞への分化を促進する因子を含む任意の培養媒体を用いることができる。そのような条件としては、例えば、DMEMに10%FBS、0.5 mMイソブチルメチルキサンチン(IBMx)、1 μMデキサメタゾン、10 μMインスリン、200 μMインドメタシンを加えた培地中での培養が挙げられるがそれらに限定されない。このような場合、培養条件として、37℃、酸素20%、炭酸ガス5%および湿度100%が使用され得る。

#### 【0040】

本明細書において「分化細胞への分化を促進する因子」、「分化促進剤」または「分化促進因子」とは、分化細胞への分化を促進することが知られている因子(例えば、化学物質、温度など)であれば、どのような因子であってもよい。そのような因子としては、例えば、種々の環境要因を挙げることができ、そのような因子としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、化学物質(例えば、ステロイド、抗生物質など)などまたはそれらの任意の組み合わせが挙げられるがそれらに限定されない。そのような因子のうち代表的なものとしては、DNA脱メチル化剤(5-アザシチジンなど)、ヒストン脱アセチル化剤(トリコスタチンなど)、核内レセプターリガンド(例えば、レチノイン酸(ATRA)、ビタミンD<sub>3</sub>、T<sub>3</sub>など)、細胞増殖因子(アク

チビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF- $\beta$ 、BMP 2/4 など)、サイトカイン(LIF、IL-2、IL-6 など)、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチルcAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、酪酸ナトリウム、アフィディコリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。しかし、従来は、分化促進因子として、分化した細胞は想定されていなかった。分化した細胞は、むしろ、分化を抑制するような因子を放出すると考えられていたからである。

#### 【0041】

本明細書において「所望の部位に対応する」とは、細胞、組織、臓器などに言及する場合、本発明における移植または再生などを目的とするときの、目的とする部位から取得したか(例えば、心臓であれば、心臓由来の細胞)または目的とする部位に存在する細胞などと実質的に同じ性質を有する細胞など(例えば、心臓細胞へと分化させた細胞)を包含する。したがって、所望の部位に対応する細胞は、細胞表面マーカーなどの指標において実質的に同一であることによって確認することができる。

#### 【0042】

そのような所望の部位に対応する細胞などを判別するために有用なマーカーとしては、例えば、(1) 脂肪: 細胞質内におけるトリグリセリドの存在、OilRed-O染色、グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ(Glycerophosphate dehydrogenase=GPDH)活性、細胞質内のGLUT4、Ap2(脂肪酸結合タンパク質)、LPL(リポタンパク質リパーゼ)、PPAR $\gamma$  1,2(ペルオキシソーム増殖活性化レセプター $\gamma$  1,2)、やレプチン(Leptin)の発現;(2) 骨細胞、骨組織: アルカリフォスファターゼの存在、骨石灰化(カルシウムの沈着)の程度を確認する; オステオカルシン(Osteocalcin)、オステオポンチン(Osteopontin)、オステオネクチン(Osteonectin)の発現;(3) 軟骨細胞、軟骨組織: ムコ多糖の存在、タイプ2コラーゲン、コンドロイチン-4-サルフェート(chondroitin-4-sulfate)の発現・存在;(4) 骨格筋細胞: 細胞質内のミオシンの豊富な存在などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0043】

本明細書において「移植」とは、本発明の組織片、細胞、組成物、医薬などを、単独で、または他の治療剤と組み合わせて体内に移入することを意味する。本明細書において「移植片」とは、体内に移入される本発明の組織片、細胞、組成物、医薬などを意味する。本発明は、以下のような治療部位(例えば、骨など)への導入方法、導入形態および導入量が使用され得る: 本発明の医薬などの障害部位への直接注入し、貼付後に縫合し、挿入する等の方法が挙げられる。本発明の脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、分化細胞との組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して; または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に(例えば、分化促進因子)投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与または移植は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

#### 【0044】

本明細書において自己または自家とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する個体またはその一部(例えば、細胞、組織、臓器など)をいう。本明細書において自己というときは、広義には遺伝的に同じ他個体(例えば一卵性双生児)からの移植片をも含む得る。

#### 【0045】

本明細書において同種(同種異系)とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される個体またはその一部(例えば、細胞、組織、臓器など)をいう。遺伝的に異なることから、同種異系のものは、移植された個体(レシピエント)において免疫反応を惹起し得る。そのような細胞などの例としては、個体の親由来の細胞などが挙げられるがそ



れらに限定されない。

【0046】

本明細書において異種とは、異種個体から移植されるものをいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植物は異種移植物という。

【0047】

本明細書において「レシピエント」（受容者）とは、移植される細胞などを受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植される細胞などを提供する個体は、「ドナー」（供与者）という。レシピエントとドナーとは同じであっても異なってもよい。

【0048】

本発明で使用される細胞は、同系由来（自己（自家）由来）でも、同種異系由来（他個体（他家）由来）でも、異種由来でもよい。拒絶反応が考えられることから、自己由来の細胞が好ましいが、拒絶反応が問題でない場合同種異系由来であってもよい。

【0049】

本明細書において「分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態」とは、分化細胞が関与する任意の疾患、障害または異常状態をいう。このような分化細胞としては、好ましくは、間葉系細胞であることが好ましいがそれらに限定されない。

【0050】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、循環器系（血液細胞など）であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、癌性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、癌または腫瘍（例えば、白血病）およびその化学療法処置後の造血不全、血小板減少症、急性骨髄性白血病（特に、第1寛解期（High-risk群）、第2寛解期以降の寛解期）、急性リンパ性白血病（特に、第1寛解期、第2寛解期以降の寛解期）、慢性骨髄性白血病（特に、慢性期、移行期）、悪性リンパ腫（特に、第1寛解期（High-risk群）、第2寛解期以降の寛解期）、多発性骨髄腫（特に、発症後早期）；心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（たとえば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（たとえば、動脈硬化、動脈瘤）、静脈疾患（たとえば、静脈瘤）、リンパ管疾患（たとえば、リンパ浮腫）が挙げられるがそれらに限定されない。

【0051】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、神経系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、痴呆症、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷が挙げられるがそれらに限定されない。

【0052】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、免疫系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、T細胞欠損症、白血病が挙げられるがそれらに限定されない。

【0053】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、運動器・骨格系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、筋ジストロフィー、骨軟骨異形成症が挙げられるがそれらに限定されない。

【0054】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、皮膚系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹が挙げられるがそれらに限定されない。

【0055】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、内分泌系のものであ

り得る。そのような疾患または障害としては、例えば、視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患、副甲状腺（上皮小体）疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常（フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症）、無アルブミン血症、アスコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、バソプレッシン分泌異常、侏儒症、ウオルマン病（酸リパーゼ（Acid lipase）欠損症）、ムコ多糖症VI型が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0056】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、呼吸器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、肺疾患（例えば、肺炎、肺癌など）、気管支疾患が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0057】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、消化器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、食道疾患（たとえば、食道癌）、胃・十二指腸疾患（たとえば、胃癌、十二指腸癌）、小腸疾患・大腸疾患（たとえば、大腸ポリープ、結腸癌、直腸癌など）、胆道疾患、肝臓疾患（たとえば、肝硬変、肝炎（A型、B型、C型、D型、E型など）、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝癌、アルコール性肝障害、薬物性肝障害）、膵臓疾患（急性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌、嚢胞性膵疾患）、腹膜・腹壁・横隔膜疾患（ヘルニアなど）、ヒルシュスプラング病が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0058】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、泌尿器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、腎疾患（腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎癌など）、膀胱疾患（膀胱炎、膀胱癌など）が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0059】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、生殖器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、男性生殖器疾患（男性不妊、前立腺肥大症、前立腺癌、精巣癌など）、女性生殖器疾患（女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮筋症、子宮癌、子宮内膜症、卵巣癌、絨毛性疾患など）が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0060】

本明細書において「診断、予防、処置または予後上、再生のために有効な量」とは、それぞれ、診断、予防、処置（または治療）または予後において、医療上有効であると認められる程度の量をいう。このような量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができる。

#### 【0061】

別の実施形態において、本発明は、美容目的の治療、処置または改善を対象とし得る。そのような目的としては、純粹に健常状態への美容を目的とするのみならず、手術後または外傷後の変形および先天性の変形に対する美容治療も含まれる。例えば、乳房の組織増大術（豊胸術）、頬や上下眼瞼の陥凹に対する組織増大術、顔面半側萎縮症、顔面神経麻痺後の組織萎縮、漏斗胸などへの組織増大を目的として利用しうる。さらに、隆鼻術、整鼻術、オトガイ形成術（組織増大術）、前額形成術（組織増大術）、小耳症など耳介変形・奇形に対する耳介軟骨形成術へも利用できるがそれらに限定されない。

#### 【0062】

本発明が医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

#### 【0063】

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保

存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、Bmi-1またはその改変体もしくはフラグメントなどのポリペプチドまたはポリヌクレオチド、またはその改変体もしくは誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

#### 【0064】

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0065】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

#### 【0066】

以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。

#### 【0067】

本発明の細胞などは、薬学的に受容可能なキャリアと配合し、注射剤、懸濁剤、溶液剤、スプレー剤等の液状製剤として非経口的に投与することができる。薬学的に受容可能なキャリアとしては、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じ、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることができる。また、本発明の組成物には本発明の細胞以外の物質を配合することも可能である。非経口の投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膈内投与、患部への局所投与、皮膚投与など等が挙げられるがそれらに限定されない。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、pH、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。

#### 【0068】

液状製剤における溶剤の好適な例としては、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油およびトウモロコシ油等が挙げられる。

#### 【0069】

液状製剤における溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム等

が挙げられるがそれらに限定されない。

【0070】

液状製剤における懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0071】

液状製剤における等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マニトール等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0072】

液状製剤における緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩およびクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0073】

液状製剤における無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび塩酸プロカイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0074】

液状製剤における防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0075】

液状製剤における抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールおよびシステイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0076】

注射剤として調製する際には、液剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましい。通常、これらは、バクテリア保留フィルター等を用いるる過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化する。さらにこれらの処理後、凍結乾燥等の方法により固形物とし、使用直前に無菌水または無菌の注射用希釈剤（塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノールまたはこれらの混合溶液等）を添加してもよい。

【0077】

さらに、必要ならば、医薬組成物は、着色料、保存剤、香料、矯味矯臭剤、甘味料等、ならびに他の薬剤を含んでもよい。

【0078】

本発明の処置方法において使用される組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。投与する量は、処置されるべき部位が必要とする量を見積もることによって確定することができる。

【0079】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作

成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール）のような形態でも提供され得る。

#### 【0080】

本発明の方法による治療の終了の判断は、商業的に利用できるアッセイもしくは機器使用による標準的な臨床検査の結果または分化細胞の欠損に関連する疾患（例えば、骨疾患、心臓疾患、神経疾患）に特徴的な臨床症状の消滅あるいは美容状態の回復（例えば、視覚的な回復など）によって支持され得る。治療は、分化細胞の欠損などに関連する疾患（例えば、神経疾患）の再発または美容状態の損傷により再開することができる。

#### 【0081】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分を満たした1つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に任意に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。

#### 【0082】

医薬品としての毒性研究が、種々の動物モデル（例えば、マウス、ウサギ、または非げっ歯類）を用いて行われる。これらの動物モデルにおいて、一般状態、体重、摂餌量、飲水量などの観察、ならびに、血液検査、血液化学的検査、尿検査、および眼科学的検査などの検査が行われる。各種検査は、当該分野において周知であり、例えば、以下のように行われるが、これらに限定されない。

・血液学的検査：赤血球数、白血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット、血液像（白血球型別百分率）、その他網赤血球数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、などの測定を行う。例えば、血液細胞組成物を以下のように測定する：（1）薬剤がマウスに投与される（未処置のコントロールマウスもまた、使用されるべきである）；（2）各々の処置群中の1匹のマウスから尾静脈を介して血液サンプルを周期的に得る；そして（3）上記サンプルを、赤血球および白血球の数、血液細胞組成物ならびにリンパ球と多形核細胞との割合について分析する。各々の投薬レジメンについての結果とコントロールとの比較は、毒性が存在するか否かを示す。

・血液化学的検査：血清（血漿）タンパク、アルブミン、A/C比、タンパク分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ（ASAT（GOT）、ALAT（GPT））、アルカリフォスファターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リンなど）、などの測定。

・尿検査：尿量、pH、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質（ナトリウム、カリウムなど）の測定。

・眼科学的検査：肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼部・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施する。

#### 【0083】

各々の毒性研究の終了の際に、動物を屠殺することによって、さらなる研究を行い得る（好ましくは、American Veterinary Medical Association guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, (1993) J. Am. Vet. Med. Assoc. 202:229-249に従う）。次いで、各処置群からの代表的な動物が、転移、異常な病気または毒性の直接的な証拠のために全体的な検屍によって試験され得る。組織における全体の異常が記載され、組織が組織学的に試験される。体重の減少または血液成分の減少を引き起こす医薬は、主要な器官に対する有害作用を有する医薬と同様に好ましくない。一般的に、有害作用が大きいほど、その医薬は好ましくない。

#### 【0084】

## (好ましい実施形態の説明)

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

## 【0085】

## (脂肪吸引廃液からの幹細胞の調製方法)

本発明の1つの局面において、脂肪吸引廃液から幹細胞を調製する方法であって、A) 脂肪吸引廃液を得る工程；B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；および、D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程、を含む、方法が提供される。本方法において用いる脂肪吸引廃液としては、脂肪吸引時に一緒に吸引された液体（例えば、トゥメセント液および血液が挙げられるが、これらに限定されない）または、吸引脂肪を液体で洗浄する際に生じた廃液が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0086】

脂肪吸引方法は、当業者に周知である技術を用いて、実施することができる。脂肪吸引方法に用いられる装置としては、例えば、ケイセイ脱脂吸引機サルポンプSAL76-A（ケイセイ医科工業（株）、東京都文京区本郷3-19-6）が挙げられるが、これらに限定されない。例えばヒトの場合、0.0001%アドレナリン入り生理食塩水などの液体を、予定吸引脂肪量の等量から2倍量、脂肪組織内に注入し、その後、内径2-3mmのカニューレ（金属製吸引管）を用いて、-250~900mmHg程度の陰圧で吸引することによって行う。

## 【0087】

吸引した脂肪細胞を洗浄する液体として通常は、生理食塩水が用いられる。しかし、生理食塩水以外にも、単離すべき幹細胞に悪影響を与えない液体であれば、任意の液体が使用可能である。具体的には、例えば、リンゲル液、および哺乳動物培養培地（例えば、DMEM、MEM、M199、およびMCD153など）のような、任意の等張液が使用可能である。

## 【0088】

脂肪吸引廃液から幹細胞を調製する場合、必要に応じて、脂肪吸引廃液にコラゲナーゼなどの酵素処理を行なうことも可能である。しかし、脂肪吸引廃液中に含まれるコラーゲンの量は、脂肪組織と比較して少ないため、幹細胞調製の原料として脂肪吸引廃液を用いる場合、コラゲナーゼ処理に必要とされる時間、および／または酵素処理に必要とされる酵素量が、脂肪組織の場合と比較して、より少ない。

## 【0089】

脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程においては、細胞画分と、その他の成分（例えば、血漿、手術時に注入した生理食塩水、麻酔薬、止血薬、破壊された脂肪細胞から漏出した脂質成分）を分離する任意の条件を用いることができる。例えば、400~800×gでの5~15分程度の遠心分離を用いることが可能である。

## 【0090】

単離された細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程では、細胞画分を、例えば、密度勾配遠心分離法によって、その比重によって分離する。その媒体としては、密度勾配遠心分離法に使用可能な媒体を用いる。好ましい媒体は、20℃での比重が1.076~1.078 g/mlである。また、好ましい媒体のpHは、4.5~7.5である。また、媒体中の好ましいエンドトキシンレベルは0.12 EU/ml以下である。代表的な媒体としては、スクロース、フィコール（スクロースとエピクロロヒドリンの共重合体）、およびパーコール（ポリビニルピロリドンの被膜を有するコロイド状シリカ製品）が挙げられるが、これらに限定されない。フィコールは、例えば、Ficoll-Plus（ファルマシアバイオテック株式会社、東京）、His

topaque-1077 (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社、東京)、およびリンフォプレップ (Lymphoprep) (登録商標) (ニコメッド、オスロ (ノルウェー)) など名称の製品が市販されている。パーコールは、Percol1 (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社、東京) という名称の製品が市販されている。

【0091】

比重による遠心分離の条件は、Ficoll-Plusを媒体として用いる場合、400×g、30～40分であり、ヒストパックを媒体として用いる場合、370g×g、約30分であり、リンフォプレップを媒体として用いる場合、800g、約20分または1100g、約10分である。

【0092】

この比重による遠心分離において、通常最も多い細胞は、赤血球細胞であり、赤色の細胞層として確認することができる。幹細胞は、赤血球よりも比重が軽いので、幹細胞を分離する場合には、赤血球よりも軽い細胞層を収集する。好ましくは、比重1.050～1.075の範囲の細胞層を収集する。

【0093】

おおまかな細胞の比重は、パーコール、レディグラッドのような密度勾配遠心分離媒体を塩化ナトリウム溶液やスクロース溶液で調製し、収集した細胞と共にデンシティーマーカービーズ (density marker beads) を加えて遠心し、ビーズによって分けられた5～10層のうち、どの層に細胞があるかを確認することで、調べることが可能である。

【0094】

また、層に分離した細胞の回収は、例えば、ピペットを用いて行なうことができる。

【0095】

比重による遠心分離においては、セルセパレーター (例えば、血液成分分離装置ASTEC204、(株)アムコ) を使用することも可能である。

【0096】

収集された細胞を培養する培地としては、例えば、DMEM、M199、MEM、HBSS、Ham's F12、BME、RPMI1640、MCDB104、MCDB153 (KGM) が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい培地としては、DMEM、およびM199が挙げられる。

【0097】

収集された細胞は、CD13、29、44、49d、71、99、105を発現する幹細胞を含み、さらにCD31、CD34のどちらか、もしくは両方を発現する幹細胞を含む。

【0098】

本発明の1つの局面において、収集された細胞を、各種条件で培養することによって、例えば、血管内皮細胞、神経細胞細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、脂肪細胞、靱帯細胞、およびストロマ細胞を得ることが可能である。

【0099】

さらに、本発明において、以下の方法を用いて、収集された細胞群から、血管内皮前駆細胞を分離、回収することが可能である。

【0100】

得られた細胞群を血管内皮細胞用培地を用いて1%ゼラチンコート培養皿にて4～5日培養する。0.25%トリプシンで培養皿から剥がして、anti-PECAM-1ビーズと反応させて、抗体と反応した細胞のみをMACS (磁気細胞分離システム) もしくはFACS (フローサイトメトリー) を用いて分離する。分離した細胞を、再度、血管内皮細胞用培地・1%ゼラチンコート培養皿にて培養する。わずかに混在する繊維芽細胞などを除外するため、血管内皮細胞の方がトリプシンで剥がれやすいのを利用して、0.25%トリプシンを30～40秒ほど反応させて剥がれた細胞のみを回収し、別の培養皿で培養することにより、血管内皮前駆細胞に分化した細胞を単離することが可能である。(例

えば、Hutley LJ, et al: Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Nov; 281 (5): E1037-44. を参照のこと)。

#### 【0101】

本発明のさらなる局面において、幹細胞を調製するためのシステムであって：A) 脂肪吸引廃液を得るための手段；B) 脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る手段；および、C) 細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う手段；を含む、システムが提供される。このシステムによって、簡便かつ大量に幹細胞を、自動的に調製することが可能となる。

#### 【0102】

脂肪吸引廃液を得るための手段としては、減圧によって生体内から脂肪を吸引する手段が挙げられる。例えば、そのような手段としては、脂肪吸引手術（手動の陰圧注射器を用いる脂肪吸引手術、および電動の脂肪吸引器を用いる脂肪吸引手術）、ならびに皮膚を切開することによる除脂術が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0103】

脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る手段、および細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う手段としては、遠心分離装置が挙げられる。脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る場合、その条件としては、200～1200×g、3～60分間の遠心分離が挙げられ、好ましくは260～900×g、3～30分間の遠心分離、より好ましくは400～800×g、3～15分間の遠心分離、最も好ましくは400g、5～10分間の遠心分離を行う。また、フィコールを用いて、細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う場合、その条件としては、200～1200×g、10～60分間の遠心分離が挙げられ、好ましくは260～900×g、10～60分間の遠心分離、好ましくは370～1100×g、10～60分間の遠心分離、より好ましくは400～800×g、10～40分間の遠心分離、最も好ましくは400×g、30～40分間の遠心分離を行う。また、このシステムは、必要に応じて、特定の比重の細胞層を収集する手段を備える。好ましくは、収集される細胞層は、赤血球よりも比重が軽い細胞層である。そのような手段としては、手動ピペッター、手動アスピレーター、自動ピペッター、および自動アスピレーターが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0104】

本発明の幹細胞を用いて、種々の分化細胞および／または前駆細胞を得ることができる。具体的には、以下の方法を用いる。

#### 【0105】

(分化細胞を調製するための方法)

1つの局面において、本発明は、幹細胞から分化細胞を調製するための方法を提供する。幹細胞から得られる分化細胞としては、最終的に分化した細胞のみならず、前駆細胞も含まれる。

#### 【0106】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞から分化細胞を調製する方法としては、(1) 培地中に分化誘導剤（例えば、デキサメサゾンなど）を添加する方法、および(2) 所望の部位に対応する分化細胞とともに培養する方法が挙げられる。

#### 【0107】

(培地中に分化誘導剤を添加することにより、幹細胞の分化を誘導する方法)

幹細胞の分化を誘導する分化誘導剤としては、デキサメタゾン (dexamethasone) などの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、アスコルベート-2-ホスフェート (ascorbate-2-phosphate)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート (glycerophosphate)、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF・bFGF・EGF・IGF・TGFβ・ECGF・BMP・PDGFをはじめとする増殖



因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸（亜セレン酸ナトリウムなど）、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMBA）、ジメチルアセトアミド（DMA）、ジブチルcAMP（dbcAMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヨードデオキシウリジン（IdU）、ヒドロキシウレア（HU）、シトシンアラビノシド（AraC）、マイトマイシンC（MMC）、酪酸ナトリウム（NaBu）、ポリブレン、セレンウムが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0108】

使用される培地としては、本発明の細胞混合物は、混合される細胞の維持および所望の部位に対応する分化細胞への分化を維持する限り、任意の培養液を用いることができる。そのような培養液としては、例えば、DMEM、M199、MEM、HBSS（Hanks' Balanced salt solution）、Ham's F12、BME、RPMI1640、MCDB104、MCDB153（KGM）などが挙げられるがそれらに限定されない。このような培養液には、デキサメタゾン（dexamethasone）などの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチル-メチルキサンチン（IBMX）、アスコルベート-2-ホスフェート（ascorbate-2-phosphate）、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート（glycerophosphate）、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF・bFGF・EGF・IGF・TGF $\beta$ ・ECGF・BMP・PDGFをはじめとする増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸（亜セレン酸ナトリウムなど）、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMBA）、ジメチルアセトアミド（DMA）、ジブチルcAMP（dbcAMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヨードデオキシウリジン（IdU）、ヒドロキシウレア（HU）、シトシンアラビノシド（AraC）、マイトマイシンC（MMC）、酪酸ナトリウム（NaBu）、ポリブレン、セレンウムなどを1つまたはその組み合わせとして含ませてもよい。

#### 【0109】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞の脂肪細胞への分化誘導は、例えば、DMEM培地に、イソブチル-メチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリン、およびインドメタシンを添加した培地中で培養することによって行われるが、これに限定されない。

#### 【0110】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞の軟骨細胞への分化誘導は、例えば、1%のFBSを含むDMEM培地に、インスリン、アスコルベート-2-ホスフェート、およびTGF- $\beta$ 1を添加した培地中で培養することによって行われるが、これに限定されない。

#### 【0111】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞の骨細胞への分化誘導は、例えば、10%のFBSを含むDMEM培地に、デキサメタゾン、アスコルベート-2-ホスフェート、 $\beta$ -グリセロホスフェートを添加した培地中で培養することによって行われるが、これに限定されない。

#### 【0112】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞の筋細胞への分化誘導は、例えば、10%のFBSと5%のHS（馬血清）を含むDMEM培地に、デキサメタゾン、ハイドロコルチゾンを添加した培地中で培養することによって行われるが、これに限定されない。

（幹細胞と、所望の部位に対応する分化細胞とを、同時に培養することによる分化誘導）

この方法によって、所望の性質を、好ましくは均質に含有する分化細胞を一定量以上で提供することができる。この方法は、A) a) 脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、b) 所望の部位に対応する分化細胞と、を混合して混合物を得る工程；および B) 該混合物におけ

る該脂肪吸引廃液由来の幹細胞の分化が生じるに十分な条件で培養する工程、を包含する。

#### 【0113】

所望の部位に対応する分化細胞もまた、当該分野において周知の技法を用いて調製することができる。あるいは、そのような分化細胞は、市販の細胞株（例えば、ATCCなどから分譲される細胞株など）を用いることができる。分化細胞は、移植を目的とする被検体から初代培養された細胞（例えば、肝細胞、腎細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞など）を用いてもよい。そのような初代培養および細胞株の培養方法は、当該分野において周知であり、例えば、AMBOマニュアル 細胞研究法、畠中 寛・浅野 朗 共編、TaKaRa；バイオ実験イラストレイテッド（6）すくすく育て細胞培養、渡邊利雄編、秀潤社（1996）などに記載されており、本明細書においてその内容が援用される。

#### 【0114】

本発明では、分化細胞としては、所望の部位に対応するものであれば、どのような細胞を用いてもよいが、好ましくは、間葉系細胞が用いられ、そのような間葉系細胞としては、例えば、脂肪細胞、骨髄細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞および脾細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような分化細胞は、同定された細胞を用いてもよいが、性質が未知の細胞であったとしても、例えば、マーカーを用いることによって、FACSなどの分別技術を用いて所望の部位に対応する細胞を調製することができる。そのようなマーカーとしては、（1）脂肪：細胞質内におけるトリグリセリドの存在、OilRed-O染色、グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ（Glycerophosphate dehydrogenase=GDH）活性、細胞質内のGLUT4、Ap2（脂肪酸結合タンパク質）、LPL（リポタンパク質リパーゼ）、PPAR $\gamma$ 1,2（ペルオキシソーム増殖活性化レセプター $\gamma$ 1,2）、やレプチン（Leptin）の発現；（2）骨細胞、骨組織：アルカリフォスファターゼの存在、骨石灰化（カルシウムの沈着）の程度を確認する；オステオカルシン（Osteocalcin）、オステオポンチン（Osteopontin）、オステオネクチン（Osteonectin）の発現；（3）軟骨細胞、軟骨組織：ムコ多糖の存在、タイプ2コラーゲン、コンドロイチン-4-サルフェート（chondroitin-4-sulfate）の発現・存在；（4）骨格筋細胞：細胞質内のミオシンの豊富な存在などが挙げられるがそれらに限定されない。また、FACSの使用方法は、フローサイトメトリー自由自在 細胞工学別冊（秀潤社）、中内編、1999などに記載されており、本明細書においてその内容を参考として援用する。

#### 【0115】

本発明の細胞混合物には、所望の部位に対応する分化細胞への分化を促進する因子がさらに含有されていてもよい。そのような因子は、所望の分化細胞への分化を促進することが知られているまたは確認されたものであれば、どのようなものを利用してもよい。好ましい分化促進因子としては、例えば、デキサメタゾン（dexamethasone）などの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチル-メチルキサンチン（IBMX）、アスコルベート-2-ホスフェート（ascorbate-2-phosphate）、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート（glycerophosphate）、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF・bFGF・EGF・IGF・TGF $\beta$ ・ECGF・BMP・PDGFをはじめとする増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸（亜セレン酸ナトリウムなど）、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMBA）、ジメチルアセトアミド（DMA）、ジブチルcAMP（dbcAMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヨードデオキシウリジン（IdU）、ヒドロキシウレア（HU）、シトシンアラビノシド（AraC）、マイトマイシンC（MMC）、酪酸ナトリウム（NaBu）、ポリブレン、セレンウムが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0116】

本発明の細胞混合物は、混合される細胞の維持および所望の部位に対応する分化細胞への分化を維持する限り、任意の培養液を用いることができる。そのような培養液としては、例えば、DMEM、M199、MEM、HBSS (Hanks' Balanced salt solution)、Ham's F12、BME、RPMI1640、MCDB104、MCDB153 (KGM) などが挙げられるがそれらに限定されない。このような培養液には、デキサメタゾン (dexamethasone) などの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、アスコルベート-2-ホスフェート (ascorbate-2-phosphate)、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート (glycerophosphate)、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF・bFGF・EGF・IGF・TGF $\beta$ ・ECGF・BMP・PDGFをはじめとする増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、子牛血清、馬血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸 (亜セレン酸ナトリウムなど)、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド (HMBA)、ジメチルアセトアミド (DMA)、ジブチルcAMP (dbcAMP)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヨードデオキシウリジン (IdU)、ヒドロキシウレア (HU)、シトシンアラビノシド (AraC)、マイトマイシンC (MMC)、酪酸ナトリウム (NaBu)、ポリブレン、セレンウムなどを1つまたはその組み合わせとして含ませておいてもよい。

## 【0117】

従って、別の局面において、本発明は、脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、所望の部位に対応する分化細胞とを含む、細胞混合物を提供する。このような混合物は、細胞移植に有用であり、従来の細胞単独を用いた移植に比べて、各々の成分が少なくすむという利点もある。このほかに、従来技術と比べて有利な点としては、例えば、(1) 組織外で再生組織を作る必要がない；(2) より確実に大きな組織の再生が可能である；(3) 簡便かつ短時間の処理により実現が可能である；(4) 皮膚など臓器を切開する手術を必要とせず、針を刺すことによって細胞および組織を投与 (移植) することが可能であることなどが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0118】

ここで、細胞混合物は、脂肪の幹細胞の分化が生じるに十分な条件に暴露された後のものを用いることが好ましいが、それに限定されない。分化が生じた後のものは、そのまま移植に使用することができ、あるいは、組織または器官に分化させた後に使用してもよい。

## 【0119】

(細胞移植組成物)

別の局面において、本発明は、a) 脂肪吸引廃液由来の幹細胞；およびb) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、細胞移植のための組成物 (例えば、組織片、および移植片、ならびにこれらを含む組成物) を提供する。この移植は、所望の部位に対応する分化細胞の欠損または劣化などに伴う疾患、障害または異常状態を処置または予防するため、あるいは美容状態を処置または改善するためであれば、任意の目的で使用することができる。このような移植の場合、好ましくは、移植は、所望の部位に移植されるがそれに限定されず、最終的に所望の部位の処置または予防が可能なのであれば、本発明の細胞含有組成物は、任意の部位に投与または移植することができる。

## 【0120】

脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、分化細胞との混合比率は、所望の分化が生じる限り、どのような比率でもよいが、通常、約1:10~約10:1であり、好ましくは、約1:5~約5:1であり、より好ましくは、約1:2~約2:1であり、最も好ましくはほぼ等量で含有される。ここで、移植に使用される細胞混合物中の分化細胞および脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、本明細書において、「分化細胞を調製するための方法」において説明し

たような任意の形態を用いることができる。

【0121】

ここで、分化細胞および脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、それぞれ独立して、移植されるべき宿主に対して、異種、同種異系または同系であり得る。好ましくは、同種異系または同系であり、より好ましくは同系であるが、それに限定されない。理論に束縛されないが、同系であれば、免疫拒絶反応が抑制できるからである。しかし、拒絶反応が予測される場合は、拒絶反応を回避する工程をさらに包含してもよい。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、第12巻、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）、中山書店などに記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオール）、「タクロリムス」（プロGRAF）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の併用療法と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の併用療法の前または後にも投与され得る。

【0122】

混合される分化細胞と、脂肪吸引廃液由来の幹細胞とは、異種、同種異系または同系であり得、好ましくは、同種異系または同系であり、より好ましくは同系である。理論に束縛されないが、同種異系または同系（好ましくは同系）の方が、分化細胞と脂肪吸引廃液由来の幹細胞とが均一の細胞集団となりやすいからである。

【0123】

このような細胞混合物または組成物は、医薬として提供され得る。このような医薬は、所望の部位に対応する分化細胞の欠損または劣化などに伴う疾患、障害または異常状態を処置または予防するため、あるいは美容状態を処置または改善するために用いられる。本発明の医薬には、細胞混合物またはそれを含む組成物のほか、薬学的に受容可能なキャリアが含まれていてもよい。そのようなキャリアとしては、本明細書において記載される任意のキャリアが用いられ、その用途に応じて当業者は含ませるべき成分を改変することができる。

【0124】

（細胞混合を用いた治療および予防法）

別の局面において、本発明は、分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するため、あるいは美容状態を処置または改善するための方法を提供する。この方法は、A) 脂肪吸引廃液由来の幹細胞；およびb) 所望の部位に対応する分化細胞、を含有する、組成物を提供する工程、ならびにB) 被検体に、該組成物を投与する工程、を包含する。ここで、移植に使用される細胞混合物中の分化細胞および脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、本明細書において、「分化細胞を調製するための方法」において説明したような任意の形態を用いることができる。

【0125】

投与の方法もまた、当該分野において公知の任意の方法を用いることができる。そのような方法として、シリンジ、カテーテル、チューブなどを用いての注入が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、局所注入（皮下注入、筋肉や脂肪など臓器内注入）、静脈内注入、動脈内注入、組織上投与などを用いる。本発明のこの移植による処置または予防方法がもたらす効果としては、例えば、従来技術と比べて有利な点としては、例えば、（1）組織外で再生組織を作る必要がない；（2）より確実に大きな組織の再生が可能である；（3）簡便かつ短時間の処理により実現が可能である；（4）皮膚など臓器を切開する手術を必要とせず、針を刺すことによって細胞および組織を投与（移植）することが可能であることなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0126】

(使用)

別の局面において、本発明は、a) 脂肪吸引廃液由来の幹細胞と、b) 所望の部位に対応する分化細胞との混合物の、分化細胞の欠損に起因する疾患、障害または異常状態を処置または予防するため、あるいは美容状態を処置または改善するための医薬の調製のための使用を提供する。ここで、移植に使用される細胞混合物中の分化細胞および脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、本明細書において、「分化細胞を調製するための方法」において説明したような任意の形態を用いることができる。

【0127】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0128】

以下に示した実施例において使用した試薬は、特に言及しない限り和光純薬、Sigmaから得た。動物の飼育は、National Society for Medical Researchが作成した「Principles of Laboratory Animal Care」およびInstitute of Laboratory Animal Resourceが作成、National Institute of Healthが公表した「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication, No. 86-23, 1985, 改訂)に遵って、動物愛護精神に則って行った。ヒトを対象とする場合は、事前に同意を得た上で実験を行った。

【0129】

(実施例1: 脂肪吸引廃液の調製)

脂肪吸引手術前に予定吸引脂肪量以上の、トゥメセント液(0.0001%アドレナリンを含む生理食塩水)を皮下脂肪層に注入し(トゥメセント法(tumescent法))、その後、脂肪吸引のために内径2~3mmのカニユーレ(金属製吸引筒)を使用して、脂肪吸引手術を行った。脂肪吸引手術は、当該分野において周知であり、例えば、美容外科手術プラクティス2、市田正成・谷野隆三郎・保阪善昭 共編、文光堂、P429-469に、その方法が記載される。

【0130】

吸引脂肪を生理食塩水で洗浄した。洗浄によって生じる計5~10リットル程度の廃液のうち、細胞成分の豊富な最初の1~2リットルだけを、その後の処理に使用した。

【0131】

(実施例2: 脂肪吸引廃液からの、幹細胞懸濁液の調製)

廃液について、以下の2方法のいずれかを用いて処理することによって、幹細胞懸濁液を調製した。

【0132】

(I) 調製方法1

- 1) 脂肪吸引廃液(通常、2~4リットル程度)を400×g、10分遠心した。
- 2) 上清を捨てた。ただし、沈殿した細胞は浮遊しやすいため、アスピレーターを用いて、細胞を失わないよう慎重に吸引した。
- 3) 沈殿した細胞(ほとんどが赤血球)を50mlのポリプロピレン製チューブ数本に移し、再度遠心(400g、5分)した。
- 4) 上清を吸引し、総量が15~20mlとなるように沈殿細胞を集めた。マトリクス成分が多い場合は100μmフィルターで濾過・除去した。必要に応じて、再遠心を行った。
- 5) 50mlのチューブにフィコール(登録商標)15mlを入れ、その上に層を作るように極力ゆっくりと細胞液15~20mlを加えた。

- 6)  $400 \times g$ 、30分遠心した。(18~20℃)
- 7) 遠心後は4層に分離した。上から(A層)無細胞層(透明)、(B層)単核球層(淡赤色)、(C層)フィコール層(透明)、(D層)赤血球層(濃赤色)で、幹細胞を含む接着細胞群には含まれていた。A層を吸引後、B層および約3ml程度のC層を細胞懸濁液として回収し、50mlのチューブに移した。
- 8) 回収した細胞懸濁液に、血清加PBS(10% FBS、もしくは10%ヒト血清を加えたPBS)を加えて50mlとし、ピペッティングによる混和後、遠心( $400 \times g$ 、5分)した。
- 9) 上清を吸引し、再度血清加PBSを加えて50mlとし、ピペッティングによる混和後、遠心( $400 \times g$ 、5分)した。
- 10) 上清を吸引し、沈殿した幹細胞を含む細胞群を回収した。

#### 【0133】

##### (II) 調製方法2

- 1) クリーンベンチ内で、吸引管を用いて廃液を吸引し、フィルター(ポアサイズ;  $120 \mu m$ )付きリザーバーを通して、ろ過液を閉鎖分離バックに封入した。
- 2) セルセパレーター(血液成分分離装置ASTEC204、(株)アムコ)で遠心分離法にて3回プロセッシングを行い、比重の軽い血小板成分、比重の重い赤血球、顆粒球成分を可及的に除去した。
- 3) 幹細胞を高濃度に含む分画(約30~40ml)を採取した。単離した細胞の比重を、測定したところ、1.050~1.075の範囲であった。

#### 【0134】

おおまかな細胞の比重は、パーコール、レディグラッドのような密度勾配遠心分離媒体を塩化ナトリウム溶液やスクロース溶液で調製し、収集した細胞と共にデンシティーマーカービーズ(density marker beads)を加えて遠心し、ビーズによって分けられた5~10層のうち、どの層に細胞があるかを確認することで、調べることが可能である。

#### 【0135】

単離した細胞の写真を、図1に示す。

(実施例3: 回収した幹細胞の特徴付け)

実施例2において回収した幹細胞を、以下の手順でFACSを用いて特徴付けした。

#### 【0136】

約5mlの細胞懸濁液を、染色培地(SM; 0.5% ウシ血清アルブミンおよび0.05%  $NaN_3$ を含むPBS)で2回洗浄した。必要に応じて、細胞を計数した。

#### 【0137】

約 $1 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞懸濁液に対して、最終濃度として0.001~0.1  $\mu g/ml$ の標識化抗体(標識には、フィコエリトリン(PE)、アロフィコシアニン(APC)および/またはフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を用いた)を添加した。

#### 【0138】

氷上で30分間ほどインキュベーションした後、細胞を洗浄し、SMを用いて細胞浮遊液の濃度を $5 \times 10^5$ 細胞/ml程度に調整した。

#### 【0139】

FACS Vantage(Becton Dickinson社)を使用した。抗体の標識を指標として、単離した幹細胞における各種CDタンパク質の発現を解析した。その結果、脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、表1に示すように、CD90およびCD49dを発現するが、CD106を発現しないことが判明した。

#### 【0140】

単離した幹細胞を、DMEM培地において2回継代培養した。継代は、80%のコンフルエンス時に行った。2度の継代培養後の細胞を、上記と同様の手順でFACSによる分析を行った。その結果を以下の表1に示す。

【0141】

(表1)

(2回継代培養した後の幹細胞における種々のCDの発現)

CD	発現量
3	—
4	—
11c	—
13	++
14	—
15	—
16	—
19	—
29	++
31	+
33	—
34	+
36	+
38	—
44	+
45	—
49d	++
54	+
56	—
58	+
61	—
62E	—
62P	—
69	—
71	++
90	++
104	—
105	+
106	—
117	+
135	—
144	—
146	+
151	++
235a	—
SH3	+
STRO-1	+

「—」＝発現検出されず、

「+」＝20%以下の細胞に検出される

「++」＝20%以上の細胞に検出される

以上の結果から、脂肪吸引廃液から調製された幹細胞には、間葉系幹細胞ではあるものの、従来法によって調製される脂肪由来幹細胞群と異なり、CD31、34陽性細胞が含まれた。従って、本発明の方法によって調製された幹細胞は、血管内皮への分化（血管新生）が容易かつ高効率で可能な細胞群であることが理解できる。さらに、今回指標として用いたCD発現は、2回継代培養した後に確認されていることから、本発明の幹細胞は、継代培養後もその表現型を変化しないことが理解される。

## 【0142】

(A: 培地中に分化誘導剤を添加することによる、幹細胞の分化誘導)

(実施例4: 脂肪吸引廃液由来の幹細胞の脂肪細胞への分化誘導)

脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、以下の方法で脂肪生成性 (Adipogenic) DMEM培地で培養することによって、脂肪細胞へ分化誘導した。

## 【0143】

脂肪生成性DMEM培地の組成は、以下のとおりである:

DMEM (10% FBSを含む) 100 ml;

インブチルーメチルキサンチン (0.5 M) 100  $\mu$ l (終濃度 0.5 mM);

デキサメタゾン ( $10^{-4}$  M) 1 ml (終濃度 1  $\mu$ M);

インスリン ( $10^{-3}$  M) 1 ml (終濃度 10  $\mu$ M); および

インドメタシン (0.2 M) 100  $\mu$ l (終濃度 200  $\mu$ M)。

## 【0144】

実施例2で調製した幹細胞約30万個を上記培地中で、継代培養することなく約4週間培養した。その結果、図2に示すように、幹細胞は、貯蔵された脂肪様の物質を細胞内に含有する細胞に分化した。

## 【0145】

分化した細胞に対して、以下の方法でオイルレッド染色を行い、貯蔵された脂肪細胞様の物質が脂肪であること、および分化細胞が脂肪細胞であることを確認した。

## 【0146】

オイルレッドO染色を以下のとおりに行った:

- 1) 培地を捨て、PBSで洗浄した;
- 2) 10分間、細胞を10%ホルマリンで固定した;
- 3) 蒸留水で水洗した;
- 4) 1分間、60%イソプロピルアルコールを添加し、1分間放置した;
- 5) オイルレッドO染色液中\* に15分間放置した;
- 6) 60%イソプロピルアルコールを添加し、1分間放置した;
- 7) 蒸留水で洗浄した;
- 8) ヘマトキシリンを添加し、2分間放置することによって、核染色を行なった;
- 9) 蒸留水で洗浄した;
- 10) 炭酸リチウム液\*\* を添加し、数秒間放置することによって、色出しをした;
- 11) 蒸留水で水洗した。

\*: オイルレッドO染色液を以下の手順で調製した:

オイルレッドO 0.3 gを99%イソプロピルアルコール100 mlに溶解した。使用時にこの溶液と蒸留水を6対4の割合で混ぜよく振とうし30分後に濾過して使用した。

\*\*: 炭酸リチウム液は以下の手順で調製した:

蒸留水100 mlに炭酸リチウム飽和液(100 mlに1.54 g溶解)を3 ml加えた。

## 【0147】

染色した細胞の写真を図3に示す。図3に示されるように、実施例2で調製された幹細胞を、上記脂肪生成性DMEM培地で培養することによって細胞内に蓄積された物質が、脂肪であること、すなわち、幹細胞から分化した細胞が脂肪細胞であることが確認された。

## 【0148】

(実施例5: 脂肪吸引廃液由来の幹細胞の軟骨細胞への分化誘導)

脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、以下の方法で軟骨生成性 (Chondrogenic) DMEM培地で培養することによって、軟骨細胞へ分化誘導した。

## 【0149】

軟骨形成性DMEM培地の調製方法は、以下のとおりである:

- 1) DMEM (血清含まず、抗生物質を含む) 100 ml;



インスリン (6.25 mg/mL) 100  $\mu$ l (添加量 625  $\mu$ g) ;

アスコルベート-2-ホスフェート (5  $\mu$ M) 1 ml (終濃度 50 nM) ; および FBS 1 ml (終濃度 1%) を混合した。

2) 上記混合液を0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌後、TGF- $\beta$ 1 (1  $\mu$ g/ml) を1 ml (添加量 1  $\mu$ g) 加え、ピペティング後、4℃保管した。

#### 【0150】

実施例2で調製した幹細胞約30万個を上記培地中で、継代培養することなく約2週間培養した。その結果、図4に示すように、幹細胞は、微小細胞塊を形成する軟骨細胞様の細胞に分化した。

#### 【0151】

分化した細胞に対して、以下の方法でアルシアンブルー染色を行い、分化細胞が軟骨細胞であることを確認した。

#### 【0152】

アルシアンブルー染色を以下のとおりに行った：

- 1) 培地を捨て、PBSで洗浄した；
- 2) 10分間、10%ホルマリンで固定した；
- 3) 3%酢酸水を添加して、3分間放置した；
- 4) アルシアンブルー染色液\* を添加して、1時間放置した；
- 5) 3%酢酸水を添加して、3分間放置した；
- 6) 蒸留水で2分間洗浄した；
- 7) ケルンエヒトロート\*\* を添加して、2分間放置した；
- 8) 蒸留水で洗浄した。

\*：アルシアンブルー染色液を以下の手順で調製した：

アルシアン青8GX 1gを3%酢酸水100mlに溶解し濾過して使用した

\*\*：ケルンエヒトロート水溶液を以下の手順で調製した：

蒸留水100mlにケルンエヒトロート (ヌクレアファーストレッド) を0.1g、硫酸アルミニウムを5g添加して、煮沸溶解し、冷却後濾過して使用した。

#### 【0153】

アルシアンブルー染色した細胞の写真を図5に示す。図5に示されるように、上記軟骨形成性DMEF培地で培養することによって幹細胞から分化した細胞が軟骨細胞であることが、確認された。

#### 【0154】

(B：幹細胞と、所望の部位に対応する分化細胞とを、同時に培養することによる分化誘導)

#### (実施例6：脂肪組織の調製)

幹細胞と同時に培養する、所望の部位に対応する分化細胞として、同意を得たヒトの脂肪組織を調製した。分離は、当該分野において周知の技法を用いて行った。簡単に述べると、同意を得たヒトから得た脂肪組織吸引物からヒトの脂肪組織を無菌条件下で分離した。この組織塊は、脂肪細胞用の培地 ((500ml) 組成=イーグル培地\* 4.75g ; 10% NaHCO<sub>3</sub> 10ml ; グルタミン 0.3g ; カナマイシン (20mg/ml) 1.5ml ; ペニシリンストレプトマイシン 5ml ; FBS(10%)) 中に保存した。組織塊は、組織のまま使用してもよいし、さらに分離して脂肪細胞として使用してもよい。

\*イーグル培地成分組成 (9.5g中)

塩化ナトリウム	6400mg
塩化カリウム	400mg
塩化カルシウム (無水)	200mg
硫酸マグネシウム (無水)	97.7mg
リン酸二水素ナトリウム (無水)	108mg
硝酸第二鉄 (九水塩)	0.1mg
ブドウ糖	1000mg

ピルビン酸ナトリウム	110mg
コハク酸	106mg
コハク酸ナトリウム (六水塩)	27mg
L-アルギニン塩酸塩	84mg
L-システイン塩酸塩 (一水塩)	70.3mg
グリシン	30mg
L-ヒスチジン塩酸塩 (一水塩)	42mg
L-イソロイシン	104.8mg
L-ロイシン	104.8mg
L-リジン塩酸塩	146.2mg
L-メチオニン	30mg
L-フェニルアラニン	66mg
L-セリン	42mg
L-スレオニン	95.2mg
L-トリプトファン	16mg
L-チロシン二ナトリウム	89.5mg
L-バリン	93.6mg
重酒石酸コリン	7.2mg
葉酸	4mg
ニコチン酸アミド	4mg
パントテン酸カルシウム	4mg
塩酸ピリドキサル	4mg
リボフラビン	0.4mg
塩酸チアミン	4mg
i-イノシトール	7.2mg
フェノールレッド	5mg。

**【0155】**

(実施例7: 脂肪細胞の混合)

次に、実施例2で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞をさらなる処理をせずに、実施例6で調製した分化細胞である脂肪組織(脂肪細胞集団)と混合し、分化が促進し再生されるかどうかを確認する。

**【0156】**

まず、実施例6で調製した脂肪組織塊1ml(900mg)、またはその脂肪組織1ml(900mg)に、実施例2で調製した10mlの脂肪吸引廃液由来の幹細胞を混合したものを、SCIDマウス(日本チャールズリバー)の背部皮下に注入する。注入は、シリンジを用いて行う。4週間後の注入部位の組織を採取し、移植された組織の重量を測定し組織を調べる。

**【0157】**

脂肪吸引廃液由来の幹細胞の混合による組織重量の維持における影響が確認できる。

**【0158】**

(脂肪細胞の混合による脂肪組織再生)

脂肪吸引廃液由来の幹細胞と脂肪組織を混合した場合、再生脂肪の平均重量は、脂肪組織のみの場合よりも重く、従って、脂肪吸引廃液由来の幹細胞の影響が確認できる。SCIDマウスを移植後4週間に開くことより、脂肪吸引廃液由来の幹細胞を含む方が、組織が大きい様子が確認できる。

**【0159】**

脂肪組織のみを注入すると、通常、4週間後には約半分の重量になってしまう。これは、脂肪組織の壊死が起こったためと考えられている。脂肪吸引廃液由来の幹細胞を混合したことによって注入した重量が保たれるのは、脂肪吸引廃液由来の幹細胞が新たに脂肪組織に分化されるか、または組織の破壊を防止する機能を有していたかのいずれか、または

これらの両方の機能を有するからであると考えられる。

【0160】

(実施例 8: DMEM で維持培養した脂肪吸引廃液由来の幹細胞での効果)

実施例 2 で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を DMEM (実施例 7 におけるものと同じ) 中で維持したものを使用して同様の効果を確認する。具体的には、この調製物を実施例 7 における実施例 2 で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞の代わりに用いる。

【0161】

この方法によって、DMEM 培地中で培養した脂肪吸引廃液由来の幹細胞の添加による脂肪組織の増殖が確認できる。したがって、脂肪吸引廃液由来の幹細胞は、取得後、培養し増殖させて維持したものであっても用いることができる。

【0162】

(実施例 9: M-199 で培養した脂肪吸引廃液由来のものの効果)

M-199 で培養したものを、実施例 7 における実施例 2 で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞の代わりに用いる。M-199 の組成は以下のとおりである。

【0163】

M-199 組成:

血管内皮細胞用培地 (1 リットル分の組成)

*medium199	9.5g
NaHCO <sub>3</sub>	2.2g
FBS	(15%)
acidic-FGF	2 $\mu$ g
ヘパリン	5mg
Antibiotic-Antimycotic (抗生剤)	10ml
(注) *M199 組成 mg/ml	
L-アラニン	50
L-アルギニン・HCl	70
L-アスパラギン酸	60
L-システイン	0.1
L-シスチン	20
L-グルタミン酸	150 (H <sub>2</sub> O)
L-グルタミン	100
グリシン	50
L-ヒスチジン・HCl・H <sub>2</sub> O	20
ヒドロキシ-L-プロリン	10
L-イソロイシン	40
L-ロイシン	120
L-リシン・HCl	70
L-メチオニン	30
L-フェニルアラニン	50
L-プロリン	40
L-セリン	50
L-トレオニン	60
L-トリプトファン	20
L-チロシン	40
L-バリン	50
グルタチオン (還元型)	0.05
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	264.9
KCl	400
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	97.7 (無水型)
NaCl	6800

NaHCO <sub>3</sub>	2200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140 (2 H <sub>2</sub> O)
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.72
CH <sub>3</sub> COONa · 3H <sub>2</sub> O	83
フェノールレッド	15
D-ビオチン	0.01
葉酸	0.01
ニコチンアミド	0.025
パントテン酸カルシウム	0.01
ピリドキサル · HCl	0.025
ピリドキシン · HCl	0.025
リボフラビン	0.01
チアミン · HCl	0.01
アデニン	10 (SO <sub>4</sub> )
塩化コリン	0.5
ヒポキサンチン	0.3
i-イノシトール	0.05
p-アミノ安息香酸	0.05
グアニン · HCl	0.3
キサンチン	0.3
チミン	0.3
ウラシル	0.3
ニコチン酸	0.025
ビタミンA	0.1
カルシフェロール	0.1
メナジン	0.01
α-トコフェロール	0.05
アスコルビン酸	20
Tween 80	20
コレステロール	0.2
ATP · 2Na	1
アデニル酸	0.2
リボース	0.5
デオキシリボース	0.5。

## 【0164】

その結果、M-199培地で培養した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を脂肪に加えると脂肪組織が増殖することが確認できる。したがって、幹細胞は、取得後任意の培地において維持したものであっても用いることができることが理解できる。

## 【0165】

(実施例10：骨細胞での応用)

次に、骨細胞を用いて、同様の混合移植実験を行う。骨細胞は、当該分野において周知の技法を用いて、骨をマウスから採取し、骨組織とする。この骨組織と実施例2で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞とを混合して、骨に移植する。すると、骨の再生を本発明の混合移植物が支持することが分かる。

## 【0166】

(実施例11：血管新生での応用)

次に、血管細胞を用いて、同様の混合移植実験を行う。血管細胞は、当該分野において周知の技法を用いて、血管をマウスから採取し、血管組織とする。この血管と実施例2で調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞とを混合して、血管に移植する。その結果、血管の再生を本発明の混合移植物が支持することが分かる。

## 【0167】

(C：幹細胞の調製条件の検討)

(実施例11：密度勾配遠心分離条件の検討)

実施例2「脂肪吸引廃液からの、幹細胞懸濁液の調製」の「調製方法1」における細胞層の密度勾配遠心分離条件は、フィコールを用いた、 $400\times g$ 、30分間の遠心であった。次に、この密度勾配遠心分離の条件をより詳細に検討する。

## 【0168】

(1) 使用する媒体の検討

フィコール以外の使用可能な密度勾配遠心分離の媒体としては、パーコール（登録商標）、ヒストパーク（登録商標）、およびリンフォプレップが挙げられる。これらを用いて細胞層の密度勾配遠心分離を行って、フィコールの場合の結果と比較する。単離した細胞をFACSで測定する。最も良好な純度を示す媒体は、フィコールである。

## 【0169】

(2) 遠心分離条件の検討

実施例2では、 $400\times g$ 、30分間、遠心分離をおこなった。そこで、次に、遠心分離の条件を検討する。

## 【0170】

$200\times g$  60分間、 $400\times g$  20分間、 $400\times g$  30分間、 $400\times g$  40分間、 $600\times g$  30分間および $800\times g$  20分間、フィコールを媒体として使用し、幹細胞を単離する。細胞の純度をFACSで検討する。 $400\times g$  30分間の場合に最も高純度かつ高収率で、幹細胞を単離できる。

## 【0171】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

## 【0172】

本発明は、簡便な方法で取得できる脂肪吸引廃液由来の幹細胞が、再生医療に応用できることを証明した。したがって、本発明の産業上の利用は、医薬品業界において見出される。

【図面の簡単な説明】

## 【0173】

【図1】図1は、本発明の方法によって調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞の写真である。

【図2】図2は、本発明の方法によって調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、脂肪生成性DMEM培地で培養することによって誘導された分化細胞の写真である。

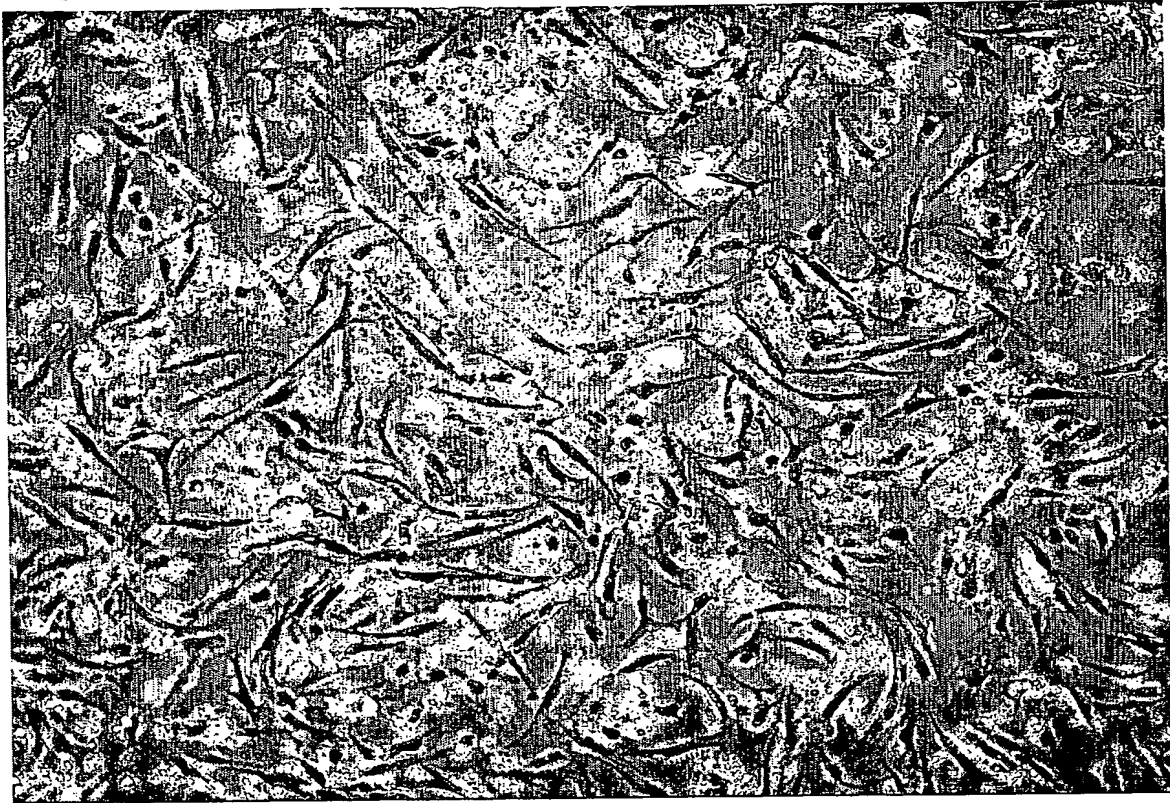
【図3】図3は、本発明の方法によって調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、脂肪生成性DMEM培地で培養することによって誘導された分化細胞を、オイルレッドO染色した写真である。

【図4】図4は、本発明の方法によって調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、軟骨形成性DMEM培地で培養することによって誘導された分化細胞の写真である。

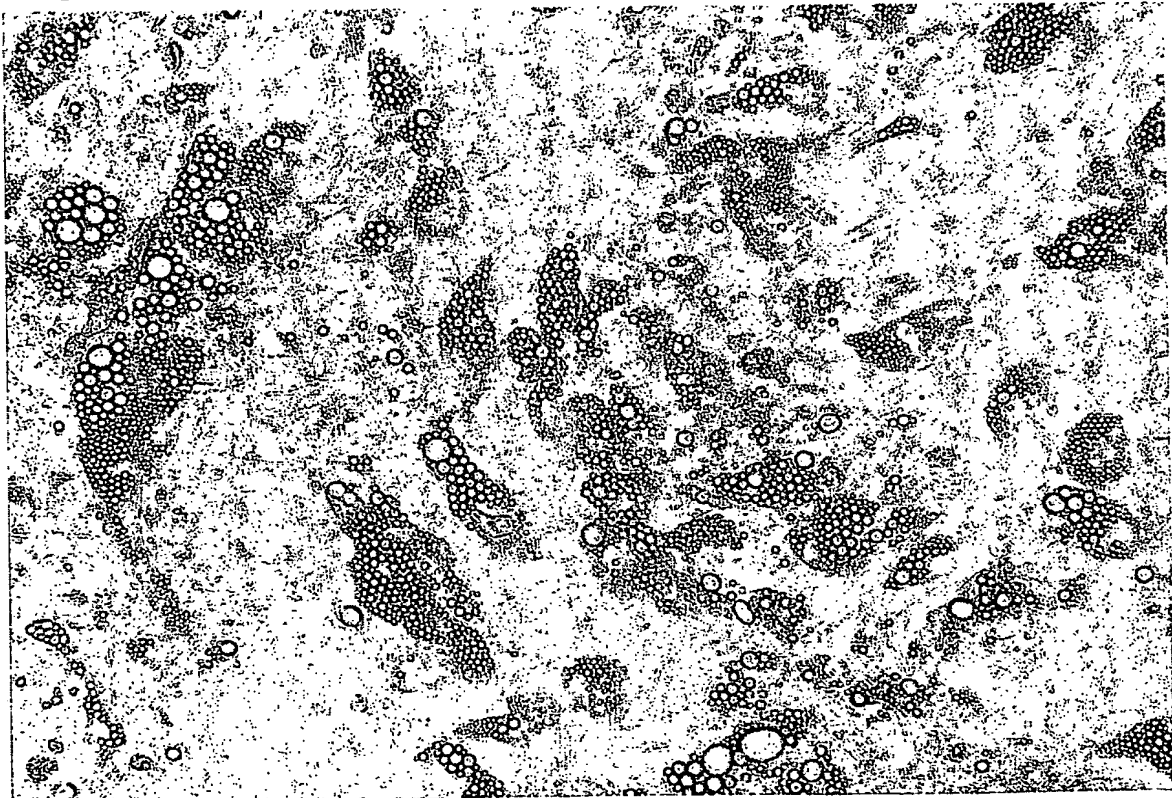
【図5】図5は、本発明の方法によって調製した脂肪吸引廃液由来の幹細胞を、軟骨形成性DMEM培地で培養することによって誘導された分化細胞を、アルシアンブルー染色した写真である。

【書類名】 図面

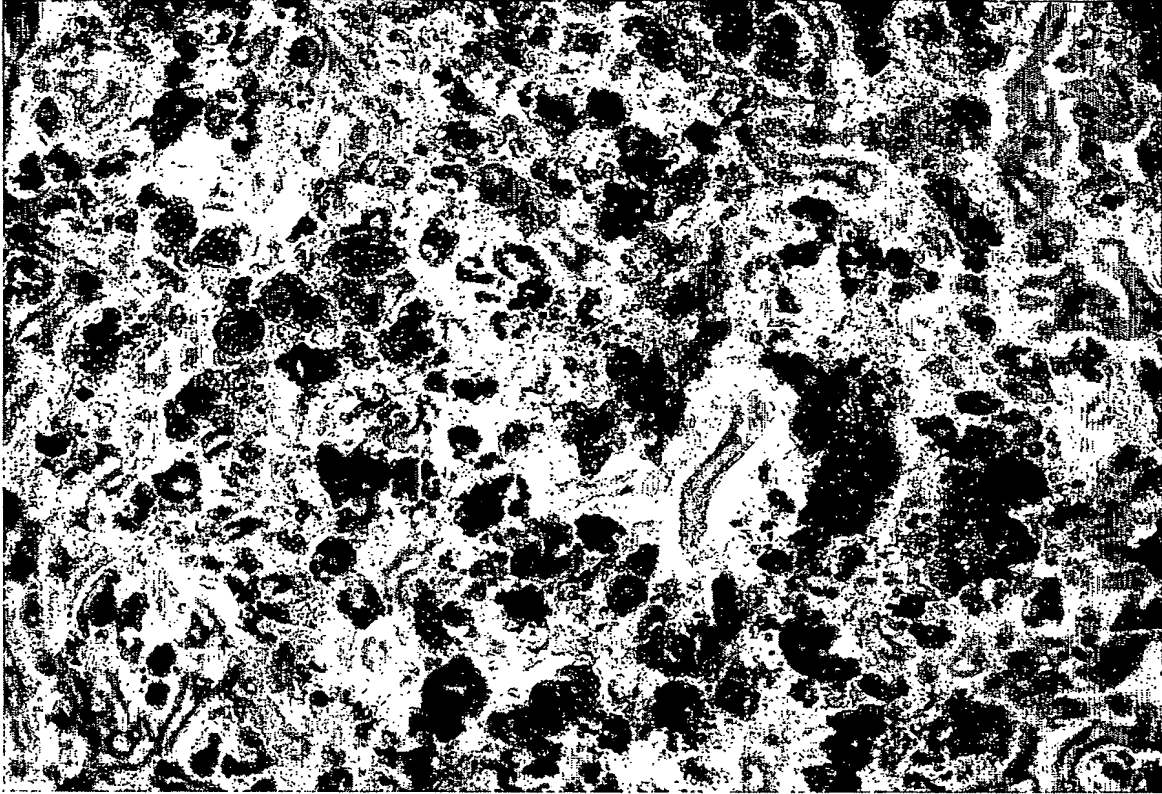
【図 1】



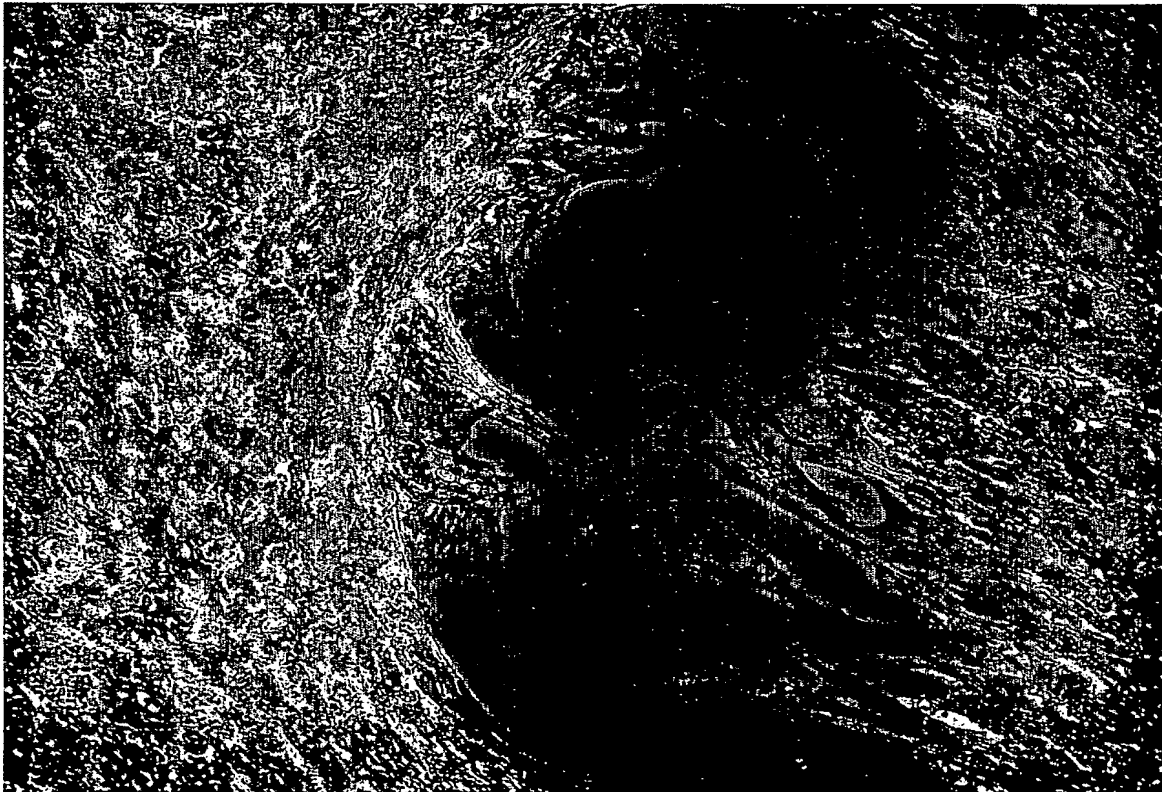
【図 2】



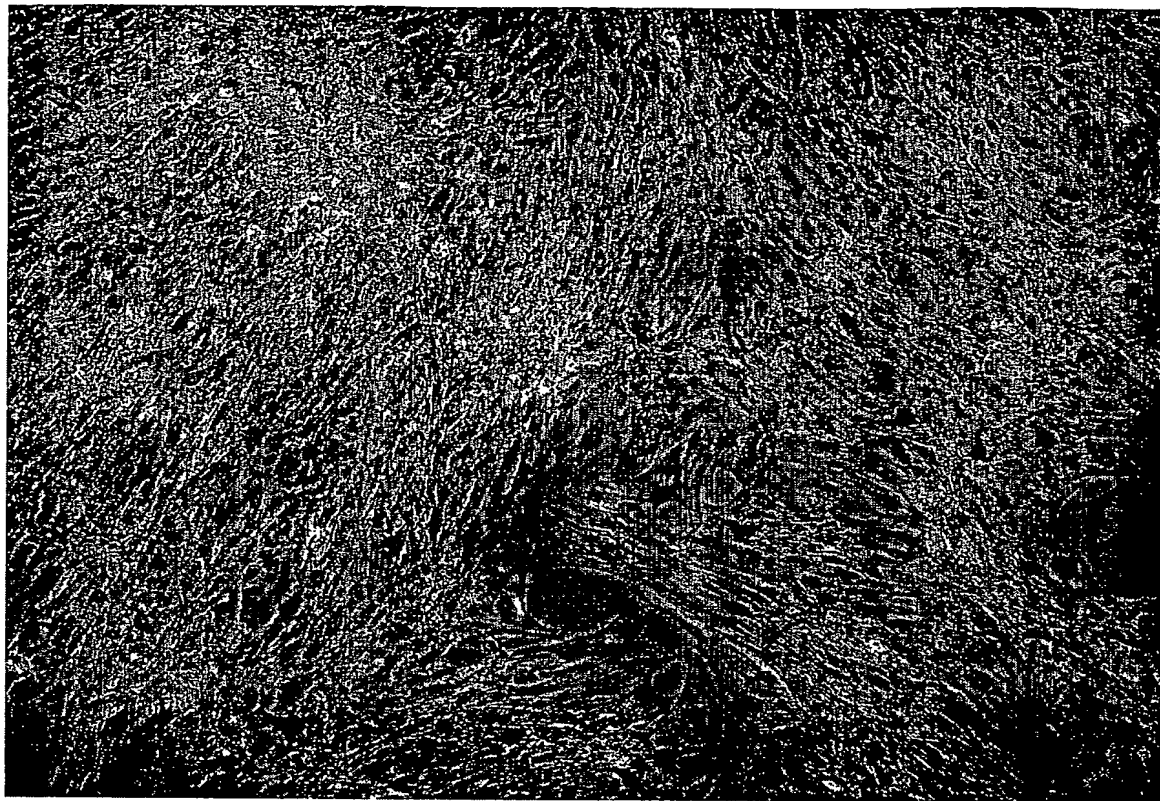
【図 3】



【図 4】



【図 5】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトから簡便かつ大量に、均質な幹細胞・前駆細胞を簡便に調製する方法を提供すること、および本発明の幹細胞・前駆細胞を用いて、組織片または移植片を大量かつ簡便に調製する方法を提供することが、本発明の課題である。

【解決手段】 幹細胞を調製する方法であって：A) 脂肪吸引廃液を得る工程；B) 該脂肪吸引廃液を遠心分離して細胞画分を得る工程；C) 該細胞画分を密度勾配遠心分離にかけて比重による細胞分離を行う工程；および、D) 赤血球よりも比重が軽い細胞層を収集する工程、を含む、方法によって上記課題が解決された。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 7 5 0 2 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 3 6 8 4 9 8 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 7 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区内幸町 1 - 1 - 1 帝国ホテルタワー 6 F  
氏 名 株式会社バイオマスター
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 5 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都千代田区内幸町 1 - 1 - 1 帝国ホテルタワー 1 2 F  
氏 名 株式会社バイオマスター